

血清 Ferritin の鉄代謝における意義

— その鉄含量と由来について —

後 藤 義 朗

札幌医科大学内科学第4講座 (主任 漆崎一朗 教授)

Significance of Serum Ferritin in Iron Metabolism

— With Special Reference to Iron Content and the Origin of Serum Ferritin —

Yoshiro GOTO

*Department of Internal Medicine (Section 4), Sapporo Medical College
(Chief : Prof. I. Urushizaki)*

Ferritin is known to be an iron storage protein which sequesters more than 2500 atoms of iron in its molecule. Serum ferritin has been in clinical use as an index of iron stores and as a marker of tumor burden. However, significance of serum ferritin with regard to iron metabolism has not been clearly understood.

In the present study, 25 to 50% sucrose gradient ultracentrifugation was employed to estimate the iron content of serum ferritin. The sedimentation patterns of liver ferritin were dependent on the concentration of the protein; as the concentration decreased, the protein sedimented at lower density areas. ^{59}Fe -labelled liver ferritin with an extreme low concentration of $30\text{ }\mu\text{g/ml}$ showed distinct radioactivities at the lower density area, virtually identical to the position of the serum ferritin indicating that irons were not released by a dilution process.

Ultracentrifugation with the gradient of 10 to 20% sucrose gave a better resolution to separate apoferritin from serum ferritin. The procedure clearly demonstrated that the latter sedimented at higher densities than the former. These results suggested the presence of iron in serum ferritin.

^{59}Fe -labelled non-viable erythrocytes were injected into rats in order to supply the RES (Reticulo-Endothelial System) with radiolabelled irons. Soon after the injection, the radioactivities were released in the form of serum ferritin and transferrin. Predominant accumulation of ferritin iron in the liver indicates that serum ferritin may play a role of iron delivery from RES to the liver.

Furthermore, rat peritoneal macrophages which phagocytized ^{59}Fe -labelled non-viable erythrocytes were prepared to investigate the origin of serum ferritin. Analyses of cultured media of the macrophages by 6 M urea polyacrylamide gel electrophoresis showed that the radioactivities were recovered in the forms of ferritin and transferrin.

It is concluded that serum ferritin does contain iron and that RES may play the role as the source of serum ferritin, which is taken up by the liver so as to deposit the excess iron flow from the RES.

Serum ferritin is therefore biologically significant not only as an index for iron store or tumor marker use but also as an iron carrier protein in iron metabolism.

(Received January 26, 1987 and accepted March 16, 1987)

Key words: Serum ferritin, Iron, Ultracentrifugation, Macrophage, Iron transport

1 結 言

これまで、血清 ferritin の生理学的役割や、鉄代謝における意義について多方面にわたり研究されてきたが、ferritin は血中に微量しか存在しないため、不明な点が多かった。その一つとして、血清 ferritin が鉄を含有するか否かについても論議の多いところである。1975 年、Worwood *et al.*¹⁾ は、ショ糖密度勾配遠心法により血清 ferritin の鉄含量の検討したところ、遠心後の peak は組織 ferritin と比べ、ショ糖の低比重域に位置した結果から、血清 ferritin は鉄含量の面から apoferritin に近いと推測した。他方、Siimes and Dallman²⁾ は、1974 年、⁵⁹Fe 標識 non-viable erythrocyte をラットへ静注し、標識された鉄を含有する ferritin が血清中に出現することを報告した。また Honda and Massover³⁾ は、実験的に作製した鉄過剰マウスの血清 ferritin 分画をゲル電気泳動法並びに鉄染色で調べ、鉄の存在を証明した。

Siimes and Dallman²⁾ や、Honda and Massover³⁾ の報告のように、血清 ferritin が鉄を含有するとすれば、鉄代謝におけるその役割はきわめて重要であると考えられる。従来、血清鉄の担送蛋白としては、transferrin が知られているが、その血中での半減期をみると、65 から 100 分であるのに対し⁴⁾、血清 ferritin の半減期は、16 から 17 分となっており、血清 ferritin は血清鉄に比べ 4 から 6 倍も速く除去されるので、この点からも血清 ferritin の鉄 transport における役割が注目されるところである。

そこで、本研究では血清 ferritin の鉄代謝における意義を明らかにする目的で、その鉄含量並びに由来について検討を加えた。

2 実験材料及び方法

2.1 実験材料

2.1.1 実験動物

ラットは、Wistar 系と Sprague-Dawley 系雄、体重 200-250 g を使用した。

鉄欠乏食はオリエンタル社製を用いた。

家兎は New Zealand white rabbit 雄、体重 2.5 kg を用いた。

2.1.2 放射性同位元素標識化合物

⁵⁹FeCl₃、⁵⁹Fe-citrate 及び Na ¹²⁵I は、第一ラジオアイソトープ研究所より購入した。⁵⁹FeCl₃ は赤血球の標識に、Na ¹²⁵I は抗ラット肝 ferritin 特異抗体の標識に用いた。

2.2 実験方法

2.2.1 ラット及びヒト肝 ferritin の抽出と精製

ラット肝及びヒト肝 ferritin の抽出精製は、渡辺・新津⁵⁾の方法に準じた。実験方法の概要を以下に述べる。ラット肝あるいはヒト肝を 4 倍量の 20 mM phosphate buffered saline (PBS) でホモジェネートし、75℃、10 分間、加熱処理後、3000 g で遠心し、その上清を 50% 飽和硫酸で塩析した。塩析された沈殿物を少量の PBS で溶解後、high performance liquid chromatography (HPLC) (column は Waters 社製 I-125) で void volume に溶出する分画を集め、濃縮後次に Sepharose 6B column (2.5×100 cm) に apply し、吸光度 280 nm でモニターし void volume に続く分画を採取した。最終的には preparative electrophoresis により ferritin monomer を得た。

すなわち、O'Farrell⁷⁾の方法に準じ、5.5% polyacrylamid gel の上部に試料約 1 ml を添加し、25 mM Tris-glycine buffer, pH 8.6 を用い、150 V、4 時間泳動後、ただちに黄褐色の ferritin band を切り出し細切した。そのゲル断片に PBS を二倍量加え、4℃一晩静置し、ferritin をゲルより溶出させた。

精製 ferritin の純度は、sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) で確認した。

2.2.2 ラット肝 apoferritin の作製

ラット肝 apoferritin は、Granick⁸⁾の方法に準じ、ラット肝 ferritin から鉄を還元除去して作製した。まず、ラット肝 ferritin を 3% sodium dithionite, 1% 2,2'-bipyridyl を含む 1 M sodium acetate buffer, pH 4.8 に 24 時間透析した。次に 1% thioglycolic acid, 1% 2,2'-bipyridyl を含む 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.6 に 24 時間透析した。その後、残存する Fe⁺⁺ を Sephadex G 25 column (1×10 cm) で除去し apoferritin を得た。

2.2.3 蛋白量の測定

ラット肝 apoferritin 並びに肝 ferritin の蛋白量は Folin-Lowry 法⁹⁾により測定した。

2.2.4 鉄量の測定

Hill¹⁰⁾の bipyridyl 法によった。すなわち、試料 1 ml に 0.05% 2,2'-bipyridyl, 6% 酢酸を含む 75 mM Na₂SO₄ を加え、蒸留水で総量 10 ml とし、100℃、1 時間加熱した。520 nm における呈色液の吸光度を読み、あらかじめ作製した検量線から鉄量をもとめた。検量線用の iron standard solution としては、原子吸光分析用 (和光純薬工業社製) を用いた。

2.3 ^{59}Fe 標識ラット肝 ferritin の作製

ラット腹腔内へ $^{59}\text{FeCl}_3$ (300 μCi) を投与し、24 時間後肝を摘出し、2.2.1 の項の様に ferritin を抽出した。精製した ^{59}Fe 標識 ferritin の specific activity は 35.7 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ protein であった。

2.4 抗ラット肝 ferritin 抗血清及び特異抗体の作製

2.4.1 抗ラット肝 ferritin 抗血清の作製

抗ラット肝 ferritin 抗血清の作製は、抽出したラット肝 ferritin を抗原として、Marcus and Zinberg¹¹⁾ の方法に準じておこなった。

得られた抗血清の力価並びに特異性の検討は、免疫二重拡散法でおこなった¹²⁾。

2.4.2 抗ラット肝 ferritin 特異抗体の精製

2.4.2.1 Immunoabsorbent column の作製

小関・新津¹³⁾ の方法に準じ、ラット肝 ferritin を CNBr-activated Sepharose 4 B (Pharmacia 社製) に固相化し immunoabsorbent column を作製した。

2.4.2.2 抗ラット肝 ferritin 特異抗体の精製

2.4.1 の項で得られた抗血清から IgG 分画を調整するため、大塚¹⁴⁾ の方法に準じ、DEAE column chromatography をおこなった。DEAE cellulose は Whatman 社製 DE 52 を用いた。

得られた IgG 分画を 2.4.2.1 で作製した immunoabsorbent column に添加し、吸着させた後、3M KSCN で溶出した。溶出分画を PBS で 72 時間透析し、精製特異抗体を得た。蛋白量は、 $\epsilon_{1\text{cm}}^{1\%} = 13.5$ として算出した。

2.5 ラット肝 ferritin の immunoradiometric assay

2.5.1 ^{125}I 標識特異抗体の作製

ラット肝 ferritin の特異抗体の ^{125}I による標識はクロラミン T 法¹⁵⁾ によった。 ^{125}I 標識抗体と free の ^{125}I の分離は Sephadex G 25 column (1 \times 10 cm) を用いておこなった。各分画の radioactivity は LKB 社製 Wallac autogammacounter (Model 8000) で測定した。

2.5.2 固相体の作製

固相体は、silicon rubber rod (3 \times 4 mm, サンコープラスチック社製) を用いた。固相化は、Watanabe *et al.*¹⁶⁾ の方法に準じ、抗ラット肝 ferritin IgG 分画を、0.25 M sodium phosphate buffer, pH 7.5 で 130 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調整した溶液中に静置することによりおこなった。

2.5.3 測定方法

まず、2.5.2 で作製した固相体を一個ずつシオノギ

チューブへ入れ、次いで incubation buffer (牛血清アルブミン 1 g/l, 正常家兎血清 1 ml/l, NaN_3 200 mg/l を含む PBS) 100 μl を分注し、次に標準蛋白 (ラット肝 ferritin) または試料 50 μl を加えた後、室温 6 時間、回転混和した。生理食塩水で 1 回洗浄後、2.5.1 の項で作製した ^{125}I 標識抗ラット肝 ferritin 特異抗体溶液 100 μl (20,000 cpm) を加え、4 $^\circ\text{C}$ 、一晚静置した。生理食塩水で洗浄後、固相体の radioactivity を計測し、ferritin 濃度を測定した。

2.6 ヒト血清 ferritin 並びに肝 ferritin の測定

ヒト血清 ferritin 並びに肝 ferritin 濃度測定は、スバック・フェリチンキット (第一ラジオアイソトープ研究所製) によった。

2.7 ショ糖密度勾配遠心法

25-50% または 10-20% のショ糖直線密度勾配を Ayad *et al.*¹⁷⁾ の方法に準じて作製した。血清あるいは肝 ferritin 溶液 0.5 ml を、あらかじめ遠心管内に作製したショ糖密度勾配溶液に重層し、29,000 rpm で 12 時間遠心した。ローターは SW 41 Ti を用い、遠心器は Model L-2 65 B (Beckman 社製) を使用した。超遠心終了後、0.5 ml 毎分画採取し、その分画中の ferritin 濃度を 2.5 または 2.6 の radioimmunoassay 法 (RIA) により測定した。

2.8 Non-viable erythrocyte の調整

2.8.1 加熱処理による調整

Siimes and Dallman²⁾ の方法に準じ、0.173 mCi のクエン酸 ^{59}Fe 溶液の半量をラットの腹腔内へ、半量を筋注した。投与 5 日後全採血し、赤血球分画を 4 $^\circ\text{C}$ の生理食塩水で 1 回洗浄した後、ACD (13.2 g sodium citrate, 4.4 g anhydrous citric acid, 14.7 g dextrose) 液 5 容と血液 1 容とを混合して、40 $^\circ\text{C}$ 、15 分間の加熱処理をおこない、 ^{59}Fe 標識赤血球浮遊液を得た。

2.8.2 抗体被覆法による調整

ラット赤血球に対する抗体は、Campbell *et al.*¹⁸⁾ の方法に準じ、生理食塩水で調整した 10% ラット赤血球浮遊液 3 ml を、2 週間にわたり家兎に計 6 回静注し作製した。

2.8.1 の項の方法で調整した (ただし加熱処理は加えていない) ^{59}Fe 標識赤血球浮遊液 $1 \times 10^9/\text{ml}$ を上述の抗血清と等容量に混合し、37 $^\circ\text{C}$ 、30 分間反応させることにより抗体被覆赤血球を得た。

2.9 抗体被覆 non-viable erythrocyte を貪食させたラット腹腔マクロファージの調整

2.8.2 の方法で調整した ^{59}Fe 標識抗体被覆

non-viable erythrocyte (Rbc)をラット 100 g 体重あたり 1×10^9 個腹腔内投与した。3 日後、西里¹⁹⁾の方法に準じ、ラット腹腔を 1% 牛胎児血清、ヘパリン 5 u/ml を添加した Eagle MEM (Gibco 社製) 40 ml で洗浄して腹腔細胞を採取した(ラット一匹につき $3.94 \pm 0.65 \times 10^7$ 個 ($n=5$)). つぎにその腹腔細胞を PBS で一度洗浄後 Eagle MEM に $2-3 \times 10^6$ /ml になるよう再浮遊させ、その 1.2-1.5 ml をあらかじめ plastic cover slip (50×100 mm) を入れた culture tube (Belloco 社製) 内で 37°C, 3 時間培養した。培養後 PBS で一度洗浄して cover slip 付着細胞をマクロファージとした。Cover slip 付着率は $41 \pm 5\%$, Wright 染色による付着細胞の % phagocytosis は $63 \pm 9\%$ であった。また、24 時間培養後のマクロファージの viability は trypan blue exclusion test によれば 97% 以上であった。なお、腹腔マクロファージの調整手順を Fig. 1 に図式化した。

2.10 血清 ferritin 並びに肝、脾 ferritin の免疫沈降法による分離

血清、肝及び脾ホモジネートからの免疫沈降法による ferritin の分画は以下の方法によった。すなわち、血清あるいは肝、脾ホモジネート加熱処理上清 100 μ l に、抗ラット肝 ferritin 抗血清 50 μ l を加え、室温 2 時間反応させ、さらに抗家兎血清抗羊血清 (第一ラジオアイソトープ研究所製) を 100 μ l 加え、4°C, 一晚反応させた後遠心し、免疫複合体を pellet として得た。

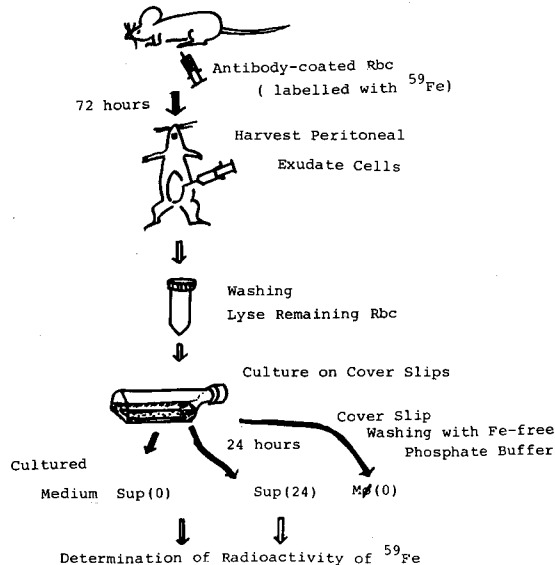


Fig. 1 Experimental procedure of preparation for rat peritoneal macrophage that phagocytized ^{59}Fe labelled non-viable erythrocyte and of cell culture on cover slip for iron release study.

2.11 6 M urea polyacrylamide gel electrophoresis (6 M urea PAGE)

6 M urea PAGE は Makey and Seal²⁰⁾ の方法に準じておこなった。混入鉄イオンを除去するため urea 溶液と acrylamide 溶液は AG 501X8 イオン交換樹脂カラム (Bio Rad 社製) を通過させた。

ゲル組成は、5.6% acrylamide, 0.23% N, N'-methylene-bis-acrylamide, 0.03% N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine, 0.5% ammonium persulfate, 6 M urea, 0.084 M Tris-borate, pH 8.4 としガラス管 (0.8×12.5 cm) 内でゲルを重合させ、Hoffer 社製電気泳動装置を用い、150 V, 16 時間泳動した。その後、lateral gel slicer (Bio Rad 社製) でゲルを厚さ 1 mm の約 90 枚の slice とし、その ^{59}Fe の radioactivity を計測した。

3 結 果

3.1 ショ糖密度勾配遠心法による ferritin の分析

3.1.1 血清 ferritin と肝組織 ferritin の比較

25-50% ショ糖密度勾配遠心法により、血清及び肝組織 ferritin を分析した結果を Fig. 2 に示した。Fig. 2 A, B, C はそれぞれ、正常人、急性肝炎並びに原発性肝癌患者血清を、Fig. 2 D は、ヒト肝 ferritin を試料としたもので、遠心後の各分画の ferritin 濃度は、ヒトの RIA 法により測定した。血清 ferritin (Fig. 2 A, B, C) の peak はいずれも Fr. 4, 5 分画に認められた。急性肝炎患者では、肝細胞壊死に伴う組織 ferritin の逸脱により、しばしば高 ferritin 血症がみられるが、その血清 ferritin の peak は、正常人血清の ferritin と比べ相違がなかった (Fig. 2 B)。一方、組織 ferritin を遠心すると、その peak は Fr. 20 と 21, すなわち ショ糖の高比重域に位置し (Fig. 2 D), 血清 ferritin の遠心パターンとは明らかに異なっていた。

3.1.2 Ferritin 濃度の遠心パターンに対する影響

3.1.1 で用いた肝 ferritin (Fig. 2 D) と血清 ferritin (Fig. 2 C) との濃度を比較するとそれぞれ 1.2 mg/ml と 1.2 μ g/ml であり、両者の間には、濃度に 1,000 倍の開きがあった。そこで、肝 ferritin を血清 ferritin とを同程度の濃度で比較するため、肝 ferritin を 5 倍、30 倍並びに 300 倍の三種の異なる濃度に希釈し、Fig. 2 と同様の条件で遠心した (Fig. 3)。その結果、肝 ferritin 濃度を希釈するに従って、遠心後の peak は、ショ糖の低比重域へ、すなわち、小さな分画番号へと移動した。肝 ferritin を 3.8 μ g/ml まで希釈すると (Fig. 3 C), その peak は Fr. 5 に位置した。この peak の位置は、ほ

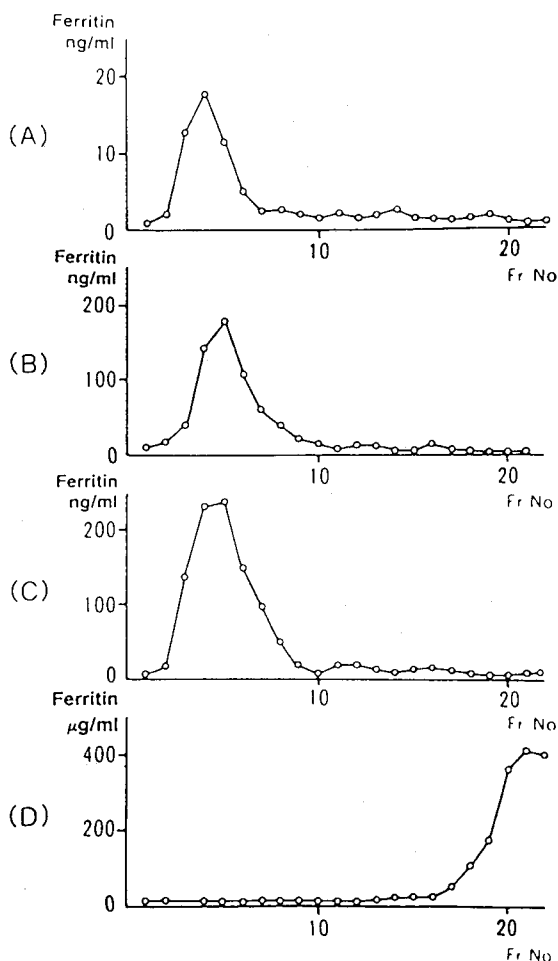


Fig. 2 Sucrose density gradient ultracentrifugation of human serum and tissue ferritin. Fractions of 0.5 ml each were collected from the top of the gradient and ferritin concentrations determined by immunoradiometric assays. Patterns were obtained from A) normal serum; B) serum from a patient with hepatitis; C) serum from a patient with hepatocellular carcinoma; D) iron-containing ferritin (1.2 mg/ml purified from normal human liver), respectively.

ほぼ同濃度の血清 ferritin のそれに一致していた (Fig. 2 A, B, C).

3.1.3 ^{59}Fe 標識肝 ferritin を用いた分析

ラットに $^{59}\text{FeCl}_3$ を腹腔内投与し, ^{59}Fe 標識肝 ferritin を作製した. 得られた ^{59}Fe 標識肝 ferritin を希釈し (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ショ糖密度勾配遠心法で検討した.

Fig. 4 に示すように, ^{59}Fe の radioactivity は, Fr. 4 から Fr. 20 に幅広く分布した. そのうち, Fr. 4 から Fr. 9 の peak の位置は, ヒト血清 ferritin のそれに一致するものであった.

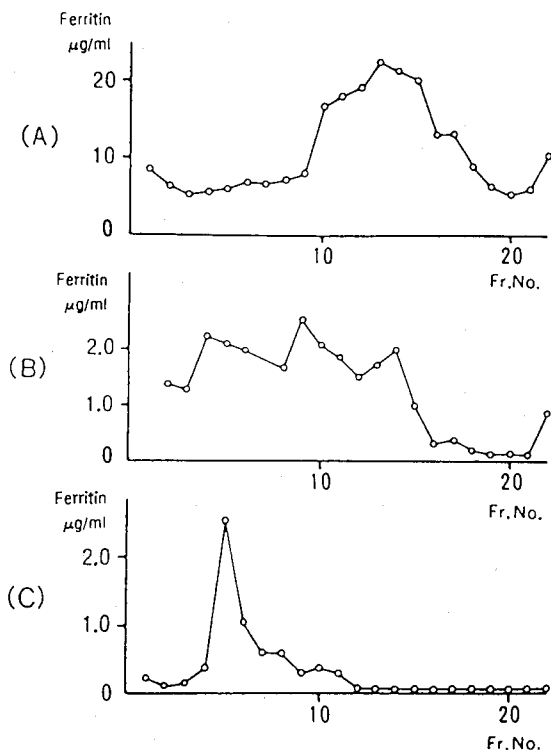


Fig. 3 Effect of concentration on sucrose density gradient ultracentrifugation patterns of ferritin. Three different concentrations of human liver ferritin were applied to the sucrose gradient centrifugation system. The protein concentrations were A) 226 $\mu\text{g}/\text{ml}$; B) 38 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and C) 3.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

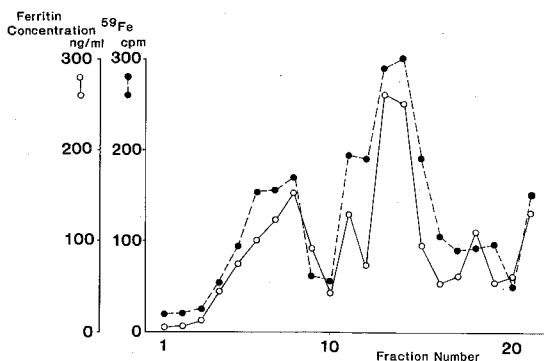


Fig. 4 Distribution of iron among ferritins of different density. The protein concentration of the rat liver ferritin was 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

一方, 各分画の ferritin 蛋白を RIA 法により測定したところ, peak は ^{59}Fe のそれと同様な分布を示した.

以上のことから, ヒト血清 ferritin 分画と一致する fraction すなわち Fr. 4 から Fr. 8 に鉄の存在が確認さ

れ、肝 ferritin の鉄が希釈操作によって失われる可能性は否定された。

3.1.4 ラット肝 apoferritin

10-20%ショ糖密度勾配遠心法によりラット肝 apoferritin 並びにヒト血清 ferritin を分析した結果を、Fig. 5 C に示した。ラット肝 apoferritin は Fr. 1 に検出されたのに対し、血清 ferritin の peak は、それより高比重域 (Fr. 4-Fr. 8) に認められ、両者の差は明らかであった。また、血清 ferritin の peak はヒト肝 ferritin を希釈したもの ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) のそれと一致していた (Fig. 5 B)。なお、同肝 ferritin を高濃度のまま遠心した場合は、Fig. 5 A に示すように最も高比重域の位置に認められた。

3.2 ^{59}Fe 標識 non-viable erythrocyte 投与ラット

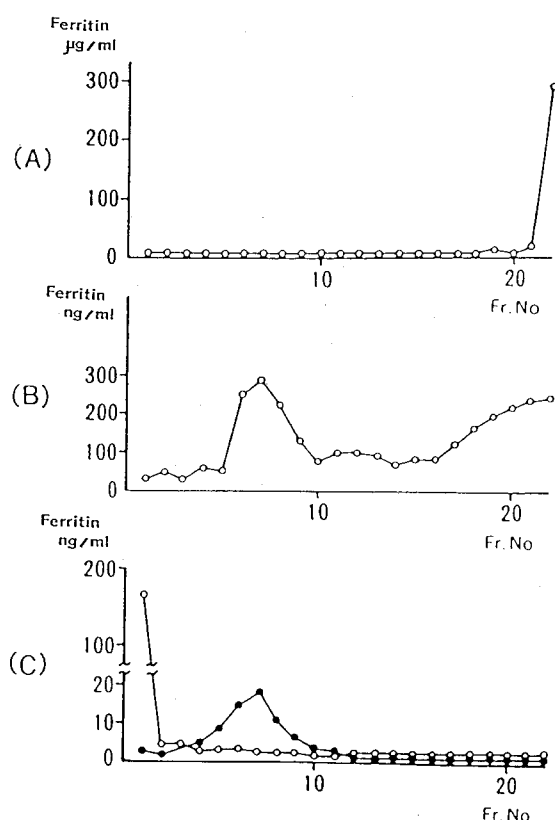


Fig. 5 Sedimentation of serum and tissue ferritins compared to rat apoferritin. A), B) Human liver ferritins at high ($400 \mu\text{g}/\text{ml}$) and low ($2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$) concentrations, respectively. C) A mixture of normal human serum (closed circles) and rat apoferritin (open circles) analyzed in the same centrifugation tube and distinguished from one another by using discrete human and rat ferritin immunoassays.

における血清及び組織 ferritin 分画中の radioactivity の経時的推移

2.8.2 の方法で調整した加熱処理 non-viable erythrocyte 浮遊液 0.5 ml をラット大腿静脈へ静注し、赤血球分画、血清 ferritin 分画並びに肝、脾 ferritin 分画を得、それらの radioactivity を経時的に測定した。その結果を Table 1 に示した。まず赤血球分画中の ^{59}Fe の radioactivity の消失率を検討したが、投与 60 分後、120 分後には、初期投与量のそれぞれ 27.2%、44.9%であった。しかし投与 120 分から 300 分までの間の消失率は初期投与量の約 2%のみであった。全経過中における赤血球分画からの ^{59}Fe の消失率は 45.3%であった。

一方、血清 ferritin 分画に出現する ^{59}Fe は、non-viable erythrocyte 投与 10 分後に $94 \pm 39 \text{ dpm}/\text{ml}$ と比較的早期から検出され、投与 60 分後には、 $930 \pm 70 \text{ dpm}/\text{ml}$ と peak を示した。他方、transferrin 結合鉄を表わす血清非 ferritin 分画をみると、血清 ferritin 分画と同様 ^{59}Fe は経時的に増加したが、最高値に達したのは、血清 ferritin 分画より遅れて、120 分後であり、血清 ferritin 分画の peak より遅れていた。

つぎに、肝及び脾 ferritin 分画を、2.10 の方法で免疫沈降法により分離し、 ^{59}Fe の radioactivity を検討した。脾 ferritin 分画における ^{59}Fe の peak は、投与 40 分後に $273 \times 10^3 \text{ dpm}$ と peak 値をとったが、肝 ferritin 分画においては、120 分後 $986 \times 10^3 \text{ dpm}$ と極大値をとった。さらに 30 分後でも $866 \times 10^3 \text{ dpm}$ と大部分の ^{59}Fe が残存していた。

以上の結果、 ^{59}Fe の経時的推移から ^{59}Fe 標識 non-viable erythrocyte 静注後 ^{59}Fe はまず脾 ferritin 分画中に取り込まれ、血清 ferritin 分画の peak を経て、肝 ferritin 分画へ移行すると考えられた。

3.3 ^{59}Fe 標識 non-viable erythrocyte 貪食マクロ

ファージから放出される鉄イオンの分析

3.3.1 培養上清に放出された radioactivity

2.9 の方法で得られたマクロファージを 24 時間培養し、抗体被覆 ^{59}Fe 標識 non-viable erythrocyte を貪食したマクロファージから培養上清中に放出される鉄イオンを分析した。

Table 2 に、cover slip に付着した培養開始時のマクロファージが保有する ^{59}Fe ($M\phi(0)$) と、培養上清 (Sup(0)) 並びに 24 時間培養後の上清中の ^{59}Fe (Sup(24)) における radioactivity を示した。Sup(24) 並びに Sup(0) はそれぞれ $2981.5 \pm 614.9 \text{ cpm}$ 、 $2293.2 \pm 557.4 \text{ cpm}$ ($n=9$) で、その差 Sup(24)-Sup(0) にあた

Table 1 Radioactivity in erythrocyte (RBC), ferritin and non-ferritin fractions of serum and ferritin fractions of the liver and spleen after injection of ^{59}Fe -labelled non-viable erythrocyte in the rats ($n=9$).

Time after injection (min.)	RBC (dpm/ml of blood $\times 10^3$)	Serum ferritin (dpm/ml of serum)	Non-ferritin serum (dpm/ml of serum)	Liver ferritin (dpm/liver $\times 10^3$)	Spleen ferritin (dpm/spleen $\times 10^3$)
10	98.7 \pm 4.3	94 \pm 39	217 \pm 32		
20	92.3 \pm 6.4	298 \pm 81	317 \pm 63	182	79
30	89.2 \pm 6.9	320 \pm 40	589 \pm 124	292	239
40	88.2 \pm 7.3	365 \pm 170	539 \pm 65	254	273
60	82.3 \pm 3.9	930 \pm 70	876 \pm 93	467	236
120	56.1 \pm 9.2	372 \pm 68	1606 \pm 272	986	161
300	54.0 \pm 12	192 \pm 55	868 \pm 81	866	90

Table 2 Recovery of ^{59}Fe released from rat peritoneal macrophages in culture medium.

Initial radioactivity of macrophage adhered to cover slip ($M\phi(0)$) (cpm)	Radioactivity in cultured media (cpm)		Sup (24) - Sup (0)	$\frac{\text{Sup (24)} - \text{Sup (0)}}{M\phi(0)} \times 100$ (%)
	0 hr (Sup (0))	24 hr (Sup (24))		
2917.2 \pm 369.3	2393.2 \pm 557.4	2981.5 \pm 614.9	688.5 \pm 87.5	23.6 \pm 3.2

る 688.5 ± 87.4 cpm が、培養上清中に放出された。この radioactivity は、培養開始時にマクロファージが保有していた ^{59}Fe の $23.6 \pm 3.2\%$ に相当した。

3.3.2 培養上清の 6 M urea PAGE による検討

培養マクロファージの放出した ^{59}Fe を結合するキャリア蛋白について検討した。まず、radioactivity の高い 24 時間培養上清を得るため、 1×10^{10} 個の ^{59}Fe 標識抗体被覆赤血球を食食させた。この培養上清を 2×11 の方法による 6 M urea PAGE で泳動し、ゲルの各 slice

の radioactivity を測定した結果が Fig. 6 である。4 個の小 peak が観察されたが、標準蛋白として、transferrin (Trf) を用いて対比すると、最初の peak からそれぞれ apotransferrin (apo-Trf), monoferric Trf (A-site), monoferric Trf (B-site), 及び diferric Trf に一致していた。しかし apotransferrin は当然鉄を保有していないので apoferritin でないことは明らかである。そこで抗ラット肝 ferritin 抗体で処理した培養上清を、6 M urea PAGE で分析したところ Fig. 6 に示したように、第一の peak のみが消失したことから、この peak は ferritin であることが示された。

したがってマクロファージ 24 時間培養上清に放出された ^{59}Fe の radioactivity の 43% は ferritin 分画中存在し、その 50% は transferrin 分画中に存在していた。

以上の結果は、ferritin が培養マクロファージから放出される ^{59}Fe の carrier protein であること、また transferrin とほぼ同量の ^{59}Fe を保持していたことを示している。

4 考 察

血清 ferritin に関する研究は、これまで主に、その臨床診断的意義、すなわち組織内貯蔵鉄の指標あるいは腫瘍マーカーとしての意義を中心に進められてきた^{21,22)}。しかし、もともと組織内の ferritin 蛋白は 1 分子あたり 2500²³⁾ 以上の鉄原子を結合しており、かりにそのまま

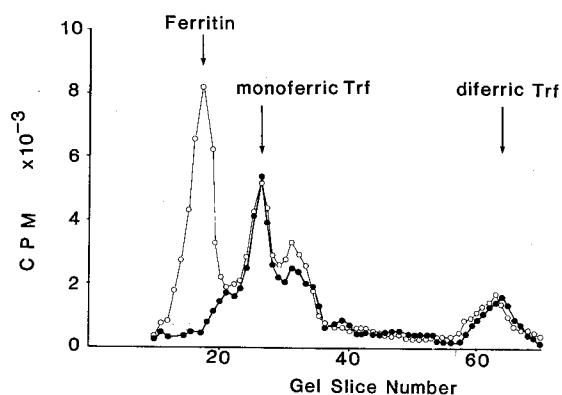


Fig. 6 6 M urea gel electrophoresis of ^{59}Fe -labelled protein released into culture medium of rat peritoneal macrophage treated with (closed circles) or without (open circles) anti-ferritin antibody. Trf; transferrin.

血中に遊出したものが血清 ferritin であるとすれば、鉄担送蛋白としての血清 ferritin の意義はきわめて重要であろうと考えられる。しかるに、実際には、そういった見地からの検討は稀であって、鉄担送蛋白としての意義づけはいまだになされていない。その大きな理由の一つに血清 ferritin の鉄含量に関する見解が一致していないという点があげられる。Worwood *et al.*¹⁾ はシヨ糖密度勾配中で血清 ferritin を遠心し、その分布パターンが、組織 ferritin と異なり、低比重域に移動したという事実を根拠にして、血清 ferritin は apoferritin であると主張した。また Arosio *et al.*²⁴⁾ や Halliday *et al.*⁵⁾ は、鉄過剰症患者血清から、血清 ferritin を抽出精製し、その鉄含量がきわめて低いことを明らかにした。

一方、Siimes and Dallman²⁾ は、加熱処理 non-viable erythrocyte をラットに静注し、その radioactivity の一部が血清 ferritin 分画に出現することを証明した。

さらに、Honda and Massover³⁾ は実験的に作製した鉄過剰症マウスを用いて、血清 ferritin が鉄を含んでいることを示した。

そこで、本研究では、まず Worwood *et al.*¹⁾ のおこなったシヨ糖密度勾配遠心法を詳細に再検討することにした。

血清 ferritin と肝 ferritin を Worwood *et al.*¹⁾ の方法にしたがい、シヨ糖密度勾配遠心法で検討したところ、血清 ferritin はシヨ糖の低比重域に、肝 ferritin は高比重域に peak が位置し、明らかに両者の遠心パターンは異なっていた。しかも、肝細胞壊死により肝 ferritin の血中への逸脱が予想される急性肝炎においても、その血清 ferritin は肝 ferritin と明らかに異なり、正常血清 ferritin と同じ比重域に分布していた。この現象を説明するには、まず第一に、組織 ferritin が流血中に出現する際、何らかの機序で鉄が奪われるか、あるいは、Puro and Richter²⁵⁾ や Adelman *et al.*²⁶⁾ が推定したように membrane bound ribosome で作られる apoferritin 分画のみが流出する可能性、第二には、遠心の過程で、シヨ糖の中で何らかの機序により鉄イオンが除かれるか、あるいは一見 apoferritin の如き挙動を示す可能性が考えられ、それらの点につきさらに検討を加えた。

まず、遠心という操作により artifact が生ずる可能性について検討を加えた。第一におこなったのは、遠心パターンにおける濃度依存性の検討である。まず 226 $\mu\text{g/ml}$ 、38 $\mu\text{g/ml}$ 、3.8 $\mu\text{g/ml}$ と異なる三種の濃度の

肝 ferritin を上述のシヨ糖密度勾配遠心法で検討したところ、濃度が低いものほどその peak は低比重域へ移動した。ここで用いた試料は同一の肝 ferritin を希釈したものであり、低濃度のものも当然鉄を含んでいると解釈される。しかるに、3.8 $\mu\text{g/ml}$ の濃度の肝 ferritin が、遠心パターン上血清 ferritin と同じ挙動を示したことは、sucrose gradient ultracentrifugation によって血清 ferritin と肝 ferritin の鉄含量の差異を論ずることの危険性を示していた。しかし、それでは何故に希釈操作により peak が低濃度域へ移動するかについては、今回の検討では明らかにし得なかった。可能性としては、高濃度での ferritin 分子の会合、低濃度での解離があげられるが推定の域を出ない。

なお、念のため、希釈操作により肝 ferritin から鉄が喪失する可能性を否定する目的で、⁵⁹Fe で標識した肝 ferritin について同様にシヨ糖密度勾配遠心法により分析したところ、シヨ糖の低比重域に位置した ferritin 分画にも ⁵⁹Fe が明らかに認められた。

次に、血清 ferritin が apoferritin とは異なることを直接証明するために、シヨ糖密度勾配を変化させ検討した。Worwood *et al.*¹⁾ が用いたシヨ糖密度勾配は 20-40% であり、この条件で遠心をおこなうと、血清 ferritin と apoferritin とは、両者とも遠心管の上部に位置してしまい、両者の比較は不可能である。そこで、本研究では、シヨ糖密度勾配を 10-20% としたところ、血清 ferritin と apoferritin との peak をそれぞれ明確に分離できた。すなわち、血清 ferritin は apoferritin に比べ、明らかに高比重域に位置し、また肝 ferritin を血清 ferritin と同程度の濃度に希釈して同条件で遠心をおこなったものでは、血清 ferritin と同位置に移動した。以上の事実から、血清 ferritin は鉄を含有していると結論することが妥当と考えられた。

次に、*in vivo* における Siimes and Dallman²⁾ の研究を再検討した。⁵⁹Fe 標識 non-viable erythrocyte をラットに静注すると、60 分後に血清 ferritin 分画の ⁵⁹Fe の取り込みの peak がみられ、120 分後には、血清非 ferritin 分画（おそらくは、transferrin 分画）に peak が認められた。また脾 ferritin 分画と肝 ferritin 分画における peak は、それぞれ 40 分後、120 分後であった。これらの結果は、Siimes and Dallman²⁾ の報告に矛盾せず、RES 系に取り込まれた鉄が、transferrin 及び ferritin の形で流血中に放出され、そのうち ferritin の鉄は、肝へ担送される図式を想定させるものであった (Fig. 7)。

この推論を、さらに *in vitro* で裏付けるために、ラッ

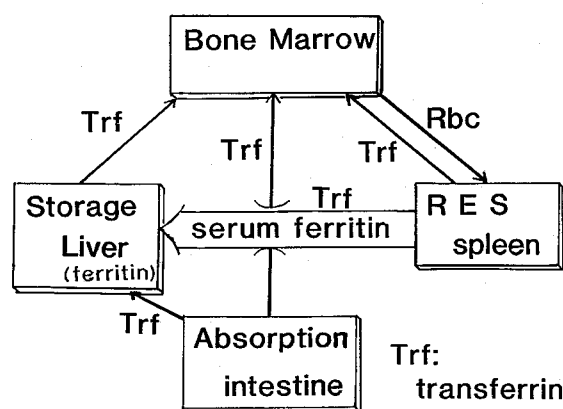


Fig. 7 Schematic representation of physiological roles of ferritin and transferrin in iron metabolism.

ト腹腔マクロファージに ^{59}Fe 標識 non-viable erythrocyte を貪食させ、RES 系のモデルを作製した。その 24 時間培養上清中に出現した ^{59}Fe の結合蛋白の分析をおこなったところ、transferrin 分画とともに、ferritin 分画にも少なからぬ量の radioactivity の出現をみた。

以上、*in vivo* 並びに *in vitro* の結果から、血清 ferritin には鉄が存在し、その由来する組織の一つとして RES 系が、また取り込まれる臓器として肝が推定された。

ところで、ヒトの生理学的状態においては、血清 ferritin 濃度は $10\ \mu\text{g}/\text{dl}$ ¹³⁾ 前後であり、その鉄飽和度を組織 ferritin と同じく約 25%²³⁾ と推定すると、鉄保有量は $2.5\ \mu\text{g}/\text{dl}$ 前後となる。また、transferrin 鉄である血清鉄の血中濃度は $110\ \mu\text{g}/\text{dl}$ 前後⁴⁾ であることが知られているので、血清 ferritin 保有鉄は、血清鉄と比べ約 1/40 と推定される。しかし、血中の半減期に注目すると、血清 ferritin は 16 から 17 分、血清鉄は 65 から 100 分⁴⁾ とされ、血清 ferritin の半減期は血清鉄に比べ 4 から 6 倍速い。したがって、単位時間あたりの鉄輸送能は必ずしも無視できるものではなく、生理的な鉄代謝においても、血清 ferritin は大きな意味をもつものと考えられる。

5 結 論

血清 ferritin の鉄代謝における意義を明らかにするために、鉄含量、由来組織、取り込まれる臓器について検討し、以下の結論を得た。

1. 25-50% ショ糖密度勾配遠心法で肝 ferritin の分布を検討した結果、低濃度の ferritin は、より低比重域に位置し、高濃度の ferritin は、より高比重域に分布し

た。極めて低濃度 ($3.8\ \mu\text{g}/\text{ml}$) の肝 ferritin は、遠心パターン上血清 ferritin と同じ挙動をとった。 ^{59}Fe 標識肝 ferritin を同様に遠心した結果、数本の peak を持った広い分布を示し、シヨ糖の低比重域の peak にも ^{59}Fe が検出された。すなわち、25-50% ショ糖密度勾配遠心法では、ferritin の濃度により分布パターンが変化するため、低比重域に位置する ferritin は必ずしも鉄含量の低い ferritin とはいえなかった。

2. 10-20% ショ糖密度勾配遠心法を用いることにより、血清 ferritin と肝 apoferritin とは、明確に分離され、血清 ferritin はより高比重域に分布した。この結果、血清 ferritin は apoferritin とは異なり、鉄を含有する可能性が示唆された。

3. ^{59}Fe 標識 non-viable erythrocyte をラットへ静注して RES 系に取り込ませ、血中への ^{59}Fe の再遊出を調べたところ血清 ferritin 分画と transferrin 分画中に活性が認められた。その内 ferritin 鉄の radioactivity は 120 分以内に肝へ取り込まれた。

4. ^{59}Fe 標識 non-viable erythrocyte を貪食させたラット腹腔マクロファージが 24 時間培養上清中に遊離した ^{59}Fe の結合蛋白を、6 M urea PAGE で分析した結果、ferritin と transferrin が同定された。

以上のことから、血清 ferritin は RES (マクロファージ) に由来し、その鉄を肝へ担送する役割を有すると考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲下さった漆崎一朗教授、新津洋司郎助教授に深謝いたしますとともに、御協力いただいた教職員各位に感謝いたします。

文 献

1. Worwood, M., Aherne, W., Dawkins, S. and Jacobs, A.: The characteristics of ferritin from human tissue, serum and blood cells. *Clin. Sci. Mol. Biol.* **48**, 441-451 (1975).
2. Siimes, M. A. and Dallman, P. R.: New kinetic role for serum ferritin in iron metabolism. *Br. J. Haematol.* **28**, 7-18 (1974).
3. Honda, T. and Massover, W. H.: Serum ferritin from siderotic mice contains iron. *Br. J. Haematol.* **49**, 653-657 (1981).
4. 刈米重夫: 放射性同位元素による血流学的検査. 臨床検査技術全書 3. 血液検査 三輪史朗編 395, 医学書院, 東京 (1972).
5. Halliday, J. W., Mack, U. and Powell, L. W.: The kinetics of serum and tissue ferritins; relation to carbohydrate content. *Br. J. Haematol.* **42**,

- 535-546 (1979).
6. 渡辺直樹, 新津洋司郎: Isoferritin の Hybrid 構造と免疫学的特性に関する研究. 札幌医誌 **48**, 385-396 (1979).
 7. O'Farrell, P. H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. J. Biol. Chem. **250**, 4007-4021 (1975).
 8. Granick, S.: Ferritin: Its properties and significance for iron metabolism. Chem. Rev. **38**, 379-403 (1946).
 9. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, L. and Randal, R.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**, 265-275 (1951).
 10. Hill, R.: A method for the estimation of iron in biological material. Proc. Roy. Soc. B. **107**, 205-212 (1931).
 11. Marcus, D. M. and Zinberg, N.: Measurement of serum ferritin by radioimmunoassay: Results in normal individuals and patients with breast cancer. J. Natl. Cancer Inst. **55**, 791-795 (1975).
 12. Ouchterlony, Ö.: Antigen-antibody reactions in gels. Acta Pathol. Microbiol. **26**, 507-515 (1949).
 13. 小関純一, 新津洋司郎: 血清 ferritin の 2-site immunoradiometric assay と鉄欠乏状態の診断に関する研究. 札幌医誌 **49**, 498-510 (1980).
 14. 大塚 忍: 人肝 Ferritin の H および L Subunit の分離精製と再構成 Ferritin の免疫生化学的性状. 札幌医誌 **49**, 579-592 (1980).
 15. Hunter, W. M. and Greenwood, F. C.: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. Nature **194**, 495-496 (1962).
 16. Watanabe, N., Niitsu, N., Ohtsuka, S., Koseki, J., Kohgo, Y., Urushizaki, I., Kato, K. and Ishikawa, E.: Enzyme immunoassay for human ferritin. Clin. Chem. **25**, 80-82 (1979).
 17. Ayad, S. R., Bonsall, R. W., and Hurt, S.: A simple method for the production of acute linear gradients using a constant speed peristaltic pump. Sci. Tools **14**, 40 (1967).
 18. Campbell, D. H., Garvey, S. J., Cramer, N. E. and Sussdorf, D. H.: Preparation of antiserum. In: Methods in immunology, 2nd ed. 159-170, W. A. Benjamin, Inc., London (1970).
 19. 西里卓次: 赤血球負荷ラット腹腔マクロファージを用いた“RE Iron Block”(網内系鉄ブロック)に関する研究. 札幌医誌 **54**, 179-193 (1985).
 20. Makey, D. G. and Seal, U.: The detection of four molecular forms of human transferrin during the iron binding process. Biochim. Biophys. Acta **453**, 250-256 (1976).
 21. 漆崎一朗: I. 血清フェリチン測定の臨床的意義. 漆崎一朗編: 血清フェリチン. 111-118, 東洋書店, 東京 (1980).
 22. 後藤義朗, 新津洋司郎: フェリチン. 肝胆膵 **11**, 533-538 (1985).
 23. Niitsu, Y. and Listowsky, I.: The distribution of iron in ferritin. Arch. Biochem. Biophys. **158**, 276-281 (1973).
 24. Arosio, P., Yokota, M. and Drysdale, J. W.: Characterization of serum ferritin in iron overload: Possible identity of natural apoferritin. Br. J. Haematol. **36**, 199-207 (1977).
 25. Puro, D. G. and Richter, G. W.: Ferritin synthesis by free and membrane-bound (poly) ribosomes of rat liver. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **138**, 399-403 (1971).
 26. Adelman, T. G., Drysdale, J. W. and Yokota, M.: Synthesis of ferritin subunits by free and membrane bound polysomes. In: Protein of iron metabolism. Brown, E. B., Aisen, P., Fielding, J. and Crichton, R. R. eds. 49-55, Grune and Stratton, N. Y. (1977).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第四講座 後藤義朗